НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Аллогенные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга вызывают реакцию отторжения

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК) известны как продуценты многих цитокинов и регуляторных молекул, участвующих в гемопоэзе. В дополнение к продукции ростовых факторов, ММСК имеют иммуносупрессивные свойства, которые могут способствовать успешной аллогенной трансплантации костного мозга [1]. *In vitro* исследования продемонстрировали, что ММСК подавляют пролиферацию Т-клеток, индуцированную аллоантигенами и митогенами [2, 3], а также индуцируют «арест» их клеточного цикла; ингибируют пролиферацию и созревание дендритных клеток и снижают продукцию цитокинов многими клетками иммунной системы [4]. Также эти клетки обладают иммуносупрессивными свойствами *in vivo*: аллогенные ММСК увеличивают выживаемость кожных аллотрансплантатов у иммунокомпетентных бабуинов [2] и предотвращают отторжение аллогенных раковых клеток у иммунокомпетентных мышей [5]. Однако механизмы их воздействия во всех случаях остаются невыясненными.

Благодаря тому, что ММСК участвуют в образовании гемопоэтической ниши, обсуждается перспектива их применения для усиления приживаемости трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток. В эксперименте были получены весомые доказательства улучшения приживаемости трансплантатов [6, 7]. Первые исследования в клинике также подтвердили выполнимость и безопасность такого подхода [8, 9]. Более того, благодаря уникальным иммунологическим свойствам ММСК, были начаты клинические испытания 2 коммерческих аллогенных HLA-несовместимых продуктов – Prochymal™ – для лечения реакции «трансплантат-против-хозяина» и болезни Крона и Provacel™ – для лечения сердечной недостаточности после острого инфаркта миокарда.

Недавно группой Nauta были проведены исследования, тестирующие иммуносупрессивные свойства аллогенных ММСК *in vivo* на моделях трансплантации костного мозга. Трансплантация собственных ММСК сублетально облучённым животным приводила к снижению отторжения трансплантата, в то время как котрансплантация костного мозга с аллогенными ММСК, напротив, приводила к усиленному отторжению.

Иммунные свойства ММСК *in vitro* исследовались в реакции смешанной культуры лимфоцитов, которая показала, что ММСК действительно ингибируют пролиферацию аллогенных спленоцитов в зависимости от концентрации. Однако *in vivo* аллогенные ММСК запускали иммунный ответ. При аллогенных трансплантациях всего лишь $0{,}5\times10^6$ ММСК происходила полная элиминация донорских лимфоцитов в течение 1 дня – это указывает на то, что инфузии клеток в таком количестве достаточно для активации Т-клеток памяти. Кинетика же элиминации донорских лимфоцитов у мышей, получивших трансфузию сингенных ММСК, ничем не отличалась от контрольной группы, которой вместо ММСК вводился фосфатно-солевой буфер, и была гораздо менее выражена, чем у реципиентов, получивших аллогенные ММСК.

Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что ММСК не обладают какими-то особыми иммунными свойствами *in vivo*, хотя и демонстрируют их в моделях *in vitro*. Авторы продемонстрировали иммуногенность аллогенных ММСК, их способность запускать Т-клеточный иммунный ответ у иммунокомпетентных животных. Более того, трансфузия аллогенных ММСК вызывала развитие клеточного иммунного ответа даже у мышей с подавленной иммунной системой.

Исследование Nauta входит в противоречие с первичными данными, полученными другими группами [1] и обостряет научную дискуссию об иммунопривилегированности ММСК. Результаты работы показывают, что введение небольшого количества несовместимых ММСК приводит к быстрому отторжению трансплантатов костного мозга в результате реакции «хозяин против трансплантата» у мышей. То есть эффекты введения ММСК зависят от HLA-совместимости донора и реципиента. На сегодняшний день показана безопасность системного введения только аутогенных [9] или HLA-совместимых ММСК [10]. Значение результатов этой работы и дискуссия особо актуальны в связи с началом клинических испытаний системного введения аллогенных несовместимых ММСК при ряде заболеваний, одобренных FDA в США. Поэтому эти данные нуждаются в проверке и подтверждении другими лабораториями. Однако результаты этой работы нельзя не учитывать при принятии решения о начале клинических испытаний протоколов введения ММСК при различных заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2005; 2: 39–42.

2. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp. Hematol. 2002; 30: 42–8.

3. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood 2002; 99: 3838–43.

4. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. Blood 2005; 105: 1815–22.

5. Djouad F., Plence P., Bony C. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. Blood 2003; 102: 3837–44.

6. Almeida-Porada G., Porada C.D., Tran N., Zanjani E.D. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early

appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. Blood 2000; 95: 3620–7.

7. Noort W.A., Kruisselbrink A.B., in't Anker P.S. et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood–derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. Exp. Hematol. 2002; 30: 870–8.

8. Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M. et al. Cotransplantation of HLA–identical sibling culture–expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. Biol. Blood Marrow Transplant. 2005; 11(5): 389–98.

9. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous–blood stem cells and culture expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high–dose chemotherapy. J. Clin. Oncol. 2000; 18: 307–16.

10. Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow–derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. Nat. Med. 1999; 5: 309–13.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам Blood. Prepublished online May 11, 2006; DOI 10.1182/blood–2005–11–011650

Иммунное отторжение мезенхимальных стромальных стволовых клеток при трансплантации во взрослый головной мозг

Многочисленные экспериментальные исследования, демонстрирующие высокую пластичность мезенхимальных стромальных стволовых клеток (ММСК), позволили перейти к испытаниям методов клеточной терапии для лечения различных заболеваний, в том числе и в неврологии [1]. Известно, что ММСК в подходящих *in vitro* условиях могут давать презумптивные нейроны [2, 3], приобретая типичный нейрональный фенотип и экспрессируя характерные для нервной ткани маркёры. Поскольку ММСК считаются иммунопривилегированными клетками и обладают иммуносупрессивным эффектом [4], исследователи изучают возможность трансплантации аллогенных клеток с терапевтической целью. Группой Coyne была показана способность аллогенных ММСК к дифференцировке в нейроны *in vivo* при трансплантации в развивающийся головной мозг крыс [5]. Донорские клетки начинали экспрессировать нейрональные маркеры и затем мигрировали в различные удалённые участки головного мозга. Более того, ММСК заселяли обширные участки фетального и неонатального мозга, экспрессируя сайт–специфические нейрональные гены и демонстрируя хорошую выживаемость [5]. Этот эксперимент показывает, что аллогенные ММСК способны к дифференцировке, миграции и длительному выживанию без иммунной реакции в эмбриональном головном мозге.

Недавно в он–лайн версии журнала Stem Cells эта же группа исследователей опубликовала новые данные по трансплантации аллогенных ММСК во взрослый, уже сформировавшийся головной мозг. Во взрослом мозге количество факторов, отвечающих за дифференцировку клеток, значительно снижено по сравнению с эмбриональным мозгом. Исследователи предположили, что ММСК, попав в мозг взрослых животных, не будут реализовывать свой потенциал так же успешно, как это происходило у эмбрионов. Однако известно, что и во взрослом мозге есть два региона, обладающих известной пластичностью. Это гиппокампальная зубчатая извилина и вентрикулярная субэпендимальная зона, клетки которых продолжают секретировать морфогенетические белки, отвечающие за пролиферацию, дифференцировку и выживание резидентных клеток–предшественников [6, 7]. Именно в эти области (гиппокамп и стриатум) авторы и выполняли трансплантации. Кроме того, авторы проверили иммуногенность аллогенных ММСК при их трансплантации. Взрослый головной мозг, в отличие от эмбрионального, обладает хорошо развитыми гуморальным и клеточным компонентами иммунной системы, которые могут повлиять на судьбу донорских клеток.

Оказалось, что в интактном взрослом головном мозге крыс в ответ на инфузию аллогенных ММСК возникает воспалительная реакция, приводящая к быстрому отторжению донорских клеток. Иммунная реакция стала основной преградой на пути выживания и стабильной интеграции в нервную ткань трансплантированных клеток.

Отторжение аллогенной донорской ткани обычно опосредуется адаптивным, или приобретённым, иммунитетом. Адаптивный иммунный ответ возникает на 10–14 сутки после трансплантации, именно столько времени требуется на презентацию антигена, селекцию и клональную экспансию Т–клеточных популяций. При гистологических исследованиях тканей, полученных от экспериментальных животных, было обнаружено, что в данном случае задействуется не приобретённый иммунитет. В области трансплантата присутствовало минимальное количество $CD8^+$ цитотоксических клеток, к тому же отторжение завершалось уже к седьмым суткам от начала эксперимента. Это свидетельствует о том, что ММСК отторгались посредством воспалительной реакции, то есть реакции врождённого иммунитета. В ней главным образом участвовали клетки микроглии (специализированные макрофаги). Обычно при травмах мозга микроглиальные клетки быстро мигрируют в зону повреждения и формируют своеобразный барьер, отделяющий нормальные клетки от разрушенных. При трансплантации ММСК наблюдался сходный эффект.

Интрацеребральная трансплантация вызывает серьёзную механическую травму мозга, поскольку продвижение канюли через мозговую паренхиму ранит локальные нервные и сосудистые структуры, что, по–видимому, и провоцирует воспаление. Уже на третьи сутки вокруг донорских клеток начиналось быстрое развитие клеток микроглии – как в стриатуме, так и в гиппокампе. На седьмые сутки фибронектин–реактивный матрикс и макрофаги формировали вокруг ММСК барьер. Сходным образом отторгались и трансплантированные в мозг эндотелиальные клетки. В то же время фетальные нейральные трансплантаты вызывали иммунный ответ, опосредованный в основном Т–клетками, и отторгались в течение 3 недель. Это указывает на то, что характер иммунной реакции контролируется характеристиками донорских клеток.

ММСК и эндотелиальные клетки продуцируют гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ–КСФ) и другие цитокины, усиливающие пролиферацию и созревание гранулоцитов и макрофагов и, соответственно,